

文章编号: 1000-0615(2017)02-0311-08

DOI: 10.11964/jfc.20160210297

红藻糖苷的提取及其对草鱼鱼糜抗冻性能的影响

高玉丽, 李九零, 严小军, 杨锐, 张春丹, 陈海敏*

(宁波大学浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 为探讨红藻糖苷的醇提工艺以及红藻糖苷对冷冻草鱼鱼糜蛋白变性作用的影响, 首先采用响应面分析法对乙醇浓度、提取温度、时间和液料比4个因素进行优化, 随后以冷冻鱼糜的盐溶性蛋白含量、巯基含量及肌原纤维蛋白Ca²⁺-ATP酶活性等参数为指标, 探测冷冻草鱼鱼糜在冷藏过程中添加红藻糖苷对蛋白质变性作用的影响。结果显示, 红藻糖苷的最佳醇提条件为乙醇72.3%、提取温度60℃、时间4h、液料比14:1(mL/g), 在此条件下的提取率为3.46%; 抗冻性能结果显示, 随红藻糖苷浓度升高, 抗冻效果增强; 以10%红藻糖苷处理冷冻鱼糜4周后, 盐溶性蛋白含量和巯基含量分别比空白组高30.62%、32.80%, 肌原纤维蛋白的Ca²⁺-ATP酶活性的下降率比空白组低37.51%, 解冻失水率的增长率比空白组低133.07%。研究表明, 红藻糖苷能有效延缓草鱼鱼糜肌原纤维蛋白的冷冻变性。

关键词: 草鱼; 鱼糜; 红藻糖苷; 响应面; 冷冻变性

中图分类号: S 983.6; TS 254.4

文献标志码: A

红藻糖苷(α -D-半乳糖-2-甘油)广泛存在于红藻门(Rhodophycophyta)各类红藻中, 含量丰富。在紫菜中, 红藻糖苷的含量可达干重的0.8%~6.1%^[1]。红藻糖苷是藻体中重要的渗透压调节剂, 其作用类似于海藻糖、甘露醇等^[2], 能够通过调节渗透压和抗氧化性, 避免生物大分子在细胞失水时的变性, 从而调节潮间带红藻在干露时的细胞失水适应性。目前海藻糖、甘露醇已被开发形成庞大的产业, 而红藻糖苷相关的应用却很少。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)生长快, 个体大, 是中国淡水养殖的四大家鱼之一^[3]。由于鱼糜制品具有低脂肪、高蛋白、食用方便、品种多样^[4]等优点, 近年来受到消费者的喜爱, 冷冻鱼糜的需求量和产量也不断增加。小分子糖类物质在鱼糜冷冻中能有效地防止蛋白质的变性, 提高鱼糜品质, 如在鲤(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼鱼糜的冷冻加工过程中都会添加海藻糖, 它能有

效地抑制蛋白质变性, 减缓凝胶强度的降低^[5-6]。刘欣等^[7]发现海藻糖对冻藏鳙(*Aristichthys nobilis*)鱼糜蛋白的变性也具有较好的抑制作用。但目前, 有关红藻糖苷对冷冻鱼糜抗冻性能的影响尚未见报道。

鉴于红藻糖苷的保水、防冻、抗氧化等生物活性^[8-9], 本实验优化了红藻糖苷的提取工艺, 并初步探讨红藻糖苷对冷冻草鱼鱼糜蛋白变性的抑制作用, 旨在为红藻糖苷在冷冻鱼糜中充当抗冻保护剂作用的研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

红藻糖苷提取自坛紫菜(*Pyropia haitanensis*), 经粉碎、醇提、乙酸乙酯萃取、阴阳离子交换树脂纯化和冻干等步骤获得, 样品经高效液相色谱-质谱联用技术检测, 其纯度超过84%^[10]。

收稿日期: 2016-02-29 修回日期: 2016-09-18

资助项目: 国家公益性行业(海洋)科研专项(201505033); 宁波市科技攻关项目(2014C10044)

通信作者: 陈海敏, E-mail: chenhaijin@nbu.edu.cn

鲜活草鱼购自农贸市场, 每条约1500 g。

1.2 响应面法优化红藻糖苷提取工艺

对红藻糖苷提取工艺中的醇提过程进行优化, 选定温度、料液比、乙醇浓度、提取时间作为变量, 采用Design-Expert 8.0.6.1软件的Box-Behnken试验设计原理, 应用4因素3水平的响应面分析法, 以红藻糖苷得率为响应值, 对其提取工艺进行优化(表1)。

表1 响应面分析因子及水平表

因子 factors	水平 levels		
	-1	0	1
温度/°C temperature	65	70	75
料液比/(mg/mL) ratio of material to liquid	1:5	1:10	1:15
乙醇浓度/% ethanol concentration	60	70	80
时间/h time	4	5	6

坛紫菜打碎成粒径1 mm左右的紫菜粉。按照响应面设计的方案进行配比反应($n=3$), 反应后溶液12 000 r/min离心15 min, 取上清液以0.22 μm 滤膜过滤, 用90%乙醇稀释后上LC-MS (TSQ Quantum Access, 美国Thermo Fisher Scientific公司)分析, 获得红藻糖苷的提取率数据^[10]。

1.3 鱼糜制作流程

活草鱼→前处理(清洗、去头、去鳞、去内脏等)→流水洗净→采肉(去骨、去皮)→漂洗→脱水→插打→添加红藻糖苷(0%、2%、5%、10%)混匀→封口→-20 °C冷冻。

1.4 盐溶性蛋白含量的测定

取鱼糜样品两份, 各0.2 g, 分别加入高浓度磷酸缓冲液(0.5 mol/L KCl, 0.01 mol/L NaH_2PO_4 , 0.03 mol/L Na_2HPO_4)和低浓度磷酸缓冲液(0.025 mol/L NaH_2PO_4 , 0.025 mol/L Na_2HPO_4)研磨。前者抽提3 h, 后者抽提1 h后离心10 min (8000 r/min, 4 °C), 上清液加入2 mL 15%三氯醋酸沉淀, 离心后取沉淀, 用1 mol/L NaOH溶解沉淀, 分别以各自缓冲液定容, 测定蛋白质含量。其中高浓度磷酸盐浸提液中的蛋白质含量减去低浓度磷酸盐浸提液中的蛋白质含量即为盐溶性蛋白质含量^[11]。

1.5 肌原纤维蛋白溶液的制备

取2 g鱼糜样品, 添加10倍量的20 mmol/L Tris-maleate缓冲液(pH 7.0, 0.05 mol/L KCl), 研磨1 min, 9000 r/min 4 °C离心10 min, 弃上清液, 沉淀加入3倍量的20 mmol/L Tris-maleate缓冲液(pH 7.0, 0.6 mol/L KCl), 研磨1 min后在4 °C提取盐溶性蛋白1 h, 离心10 min (9000 r/min, 4 °C), 上清液即为肌原纤维蛋白溶液^[7]。

1.6 巯基含量的测定

0.4 mL上述肌原纤维蛋白加入3.6 mL 50 mmol/L磷酸钾缓冲液(10 mmol/L EDTA, 0.6 mol/L KCl, 8 mol/L尿素, pH 7), 和0.4 mL 0.1% 5, 5'-二巯代双(2-硝基)苯甲酸, 反应液在40 °C保温25 min, 在波长412 nm处测定吸光值, 摩尔吸光系数为13 600 L/(mol·cm)^[11]。巯基含量(SH)按以下公式计算。

$$SH/(\text{mol/g pro})=(A \times n)/(\epsilon \times \rho)$$

式中, A : 412 nm波长处的吸光度; n : 稀释倍数; ϵ : 摩尔吸光系数13 600 L/(mol·cm); ρ : 蛋白质质量浓度(mg/mL)。

1.7 肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATP酶活性测定

参考ATP酶检测试剂盒方法测定(购于南京建成生物工程研究所)。

1.8 保水性测定

将冷冻的鱼糜样品在室温下自然解冻, 放在铺有吸水纸的容器内, 鱼片水分充分吸干后称重, 计算公式:

$$\text{解冻失水率}(\%) = \frac{\text{减少的重量}}{\text{冷冻前原有重量}} \times 100$$

1.9 数据分析

数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示($n=3$)。采用SPSS 13.0软件中的ANOVA进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 有显著差异的数据再用post-hoc testing进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 红藻糖苷提取工艺的优化

响应面分析结果见表2。运用Design-Expert 8.0.6.1软件对实验结果进行多元回归拟合, 获得回归方程:

$$y = 2.9882 + 0.1070A + 0.4698B - 0.1150C + 0.0989D + 0.0218AB + 0.08336AC - 0.0262AD + 0.1111BC - 0.2318$$

表 2 响应面分析方案及实验结果

Tab. 2 Response surface design arrangement and experimental results

A: 提取温度 extracting temperature	B: 料液比 solid-liquid ratio	C: 乙醇 ethanol concentration	D: 提取时间 extracting temperature	提取率% extraction ratio
0	0	-1	1	2.912
1	-1	0	0	2.046
0	1	0	1	3.202
-1	0	-1	0	2.526
-1	1	0	0	2.811
0	-1	1	0	1.489
0	0	0	0	3.215
0	0	0	0	2.990
0	1	1	0	2.920
-1	0	0	-1	2.440
1	0	-1	0	2.684
0	0	1	-1	2.811
0	0	0	0	3.184
-1	-1	0	0	2.083
-1	0	1	0	2.160
0	1	0	-1	3.406
0	-1	-1	0	2.115
1	0	0	1	3.070
0	0	-1	-1	3.062
0	-1	0	1	2.827
0	0	0	0	2.878
1	0	0	-1	2.802
-1	0	0	1	2.812
0	0	1	1	2.989
0	0	0	0	2.675
0	1	-1	0	3.102
1	0	1	0	2.652
0	-1	0	-1	2.104
1	1	0	0	2.861

$BD+0.0820CD-0.2877A^2-0.2854B^2-0.2284C^2+0.1487D^2$ 。

整体模型极为显著(“Pr>F”值<0.01); 失拟项不显著(“Pr>F”值=0.7225>0.05), 说明方程对实验拟合较好。对各因素间的交互作用进行响应面分析, 并绘制响应面曲线图(图1)。

根据该响应面分析, 得到红藻糖苷的最佳提取工艺为乙醇浓度72.3%、提取温度60℃、提取时间4 h、液料比14:1 (mL/g), 在该工艺下, 红藻糖苷的提取率为3.46%。为检验实验的可行性, 采用得到的最佳提取条件进行验证实验, 3次平行实验得到的平均提取率为3.13%, 与预测

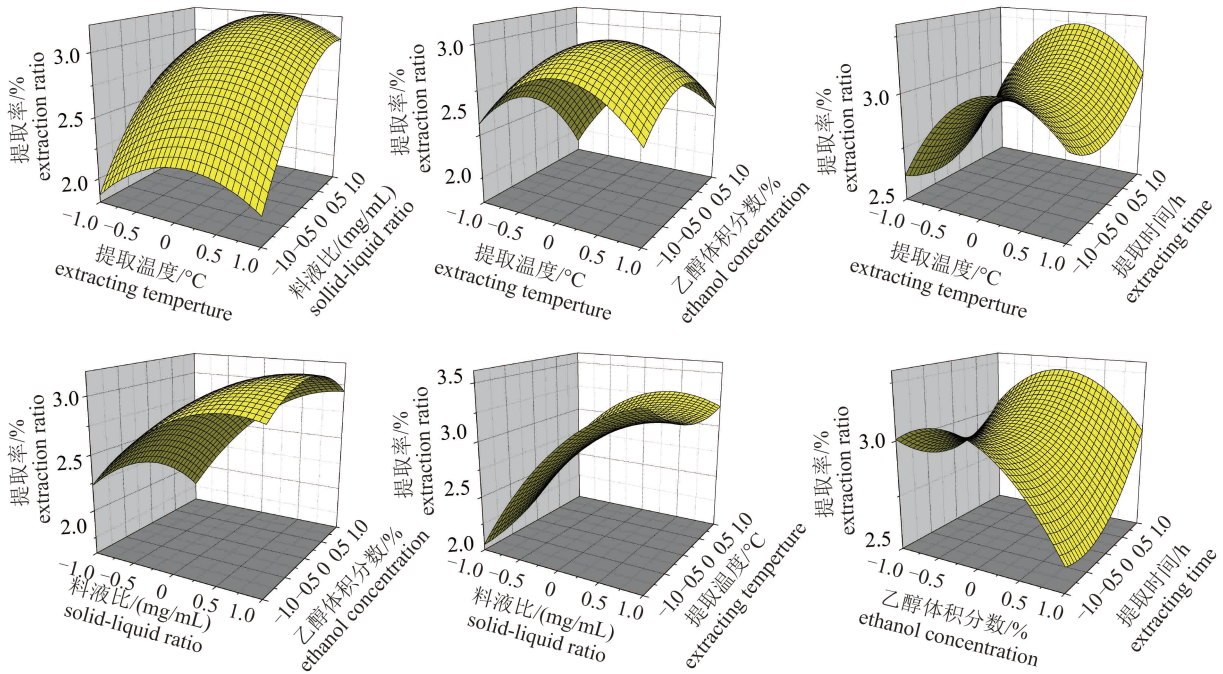


图1 各因素对红藻糖苷提取率的响应面分析

Fig. 1 Response surface curve of effect of factors on extraction of floridoside

值相差0.33%，说明该方程与实际情况的拟合性良好^[12]。

2.2 红藻糖苷对冷冻鱼糜中盐溶性蛋白含量的影响

在-20 °C冷冻时，鱼糜盐溶性蛋白含量随着冷冻时间的增加不断下降，而添加了红藻糖

苷的鱼糜的盐溶蛋白下降率相对缓慢，特别是第2~4周，5%及10%红藻糖苷组明显低于空白组 ($P<0.05$)。从0周到第4周，空白组的盐溶性蛋白含量下降了 $79.57\% \pm 0.43\%$ ，而添加2%、5%、10%红藻糖苷的草鱼鱼糜的下降率分别为 $68.11\% \pm 3.30\%$ 、 $49.31\% \pm 2.92\%$ 、 $47.74\% \pm 0.48\%$ 。但4周以后，红藻糖苷对冷冻鱼糜的抗冻影响不明显(图2)。

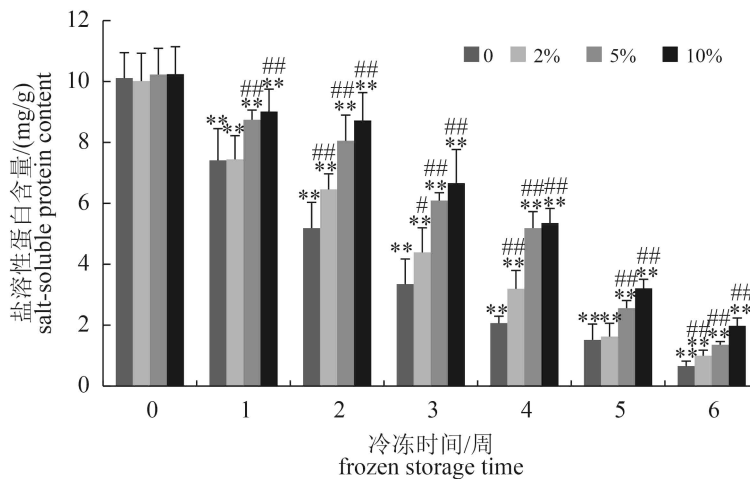


图2 草鱼鱼糜盐溶性蛋白含量变化

与未冷冻鱼糜相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与未添加红藻糖苷相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；下同

Fig. 2 The changes of salt-soluble protein content in *C. idella* during frozen storage

*. $P<0.05$, **. $P<0.01$, versus control group without storage; #. $P<0.05$, ##. $P<0.01$, versus control group without adding floridoside; the same below

2.3 红藻糖苷对冷冻鱼糜的肌原纤维蛋白中巯基含量的影响

肌原纤维蛋白中巯基含量随鱼糜冷冻时间延长呈下降趋势, 空白组在第6周时下降达88.56%±0.28%, 而红藻糖苷的添加能减缓下降, 并呈浓度梯度趋势, 如空白组在两周内的下降率为53.66%±0.75%, 而10%红藻糖苷处理组的下降率减少为28.09%±0.94% ($P<0.01$), 高出对照组25.57% (图3)。至第6周时, 10%红藻糖苷处理组的肌原纤维蛋白中巯基含量高于空白组17.65%。

2.4 红藻糖苷对冷冻鱼糜的肌原纤维蛋白Ca²⁺-ATP酶活性的影响

随冷冻时间延长, Ca²⁺-ATP酶活性整体呈下降趋势 (图4)。在冷冻开始前2周, 各组的Ca²⁺-

ATP酶活性迅速下降, 空白组的下降率为60.02%±1.92%, 而添加红藻糖苷能抑制Ca²⁺-ATP酶活性的下降。其中10%红藻糖苷组的下降率为35.32%±1.42%, 比空白组高出24.70% ($P<0.01$); 第6周, 空白组下降率为93.10%±0.94%, 而10%红藻糖苷的鱼糜Ca²⁺-ATP酶活性是未冷冻前的34.65%, 比空白组高出了27.75% ($P<0.01$)。

2.5 红藻糖苷对冷冻鱼糜保水性能的影响

随冷冻时间的变化, 鱼糜的解冻失水率越来越高, 而添加了红藻糖苷的鱼糜的增加量明显小于空白组。从第2周开始, 空白组解冻失水率快速增高, 而添加了红藻糖苷的鱼糜的解冻失水率上升相对较为缓慢, 至第6周时, 失水率的增加量低于空白组18.94% ($P<0.01$) (图5)。

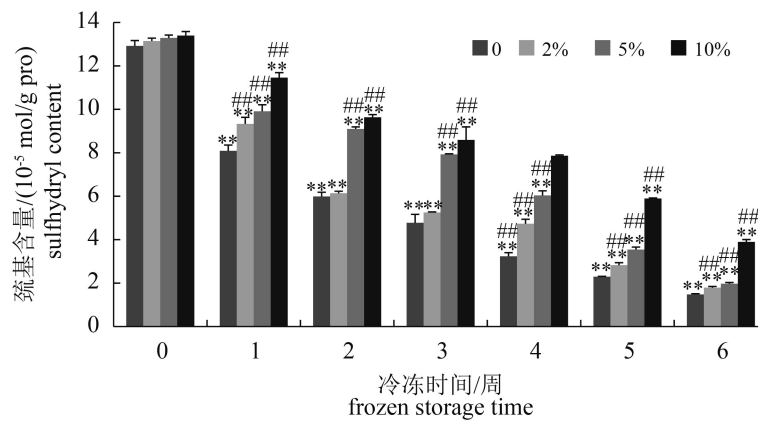


图3 草鱼鱼糜肌原纤维蛋白中巯基含量变化

Fig. 3 The changes of sulfhydryl content in *C. idella* during frozen storage

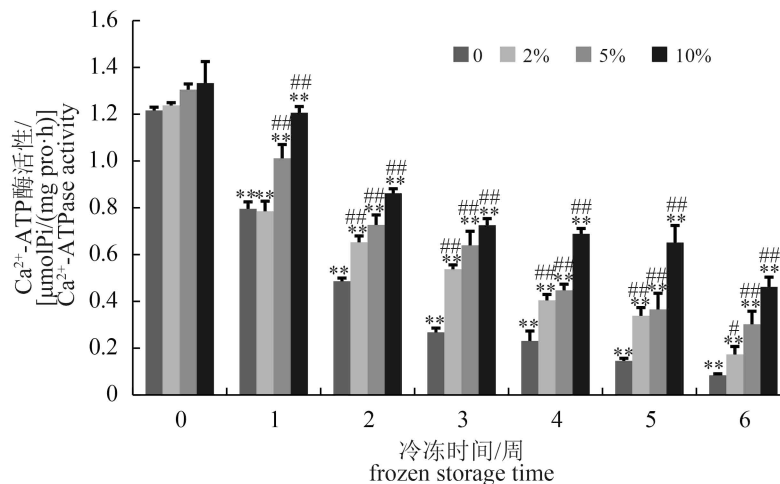


图4 Ca²⁺-ATP酶活性的变化

Fig. 4 The changes of Ca²⁺-ATPase activity in *C. idella* during frozen storage

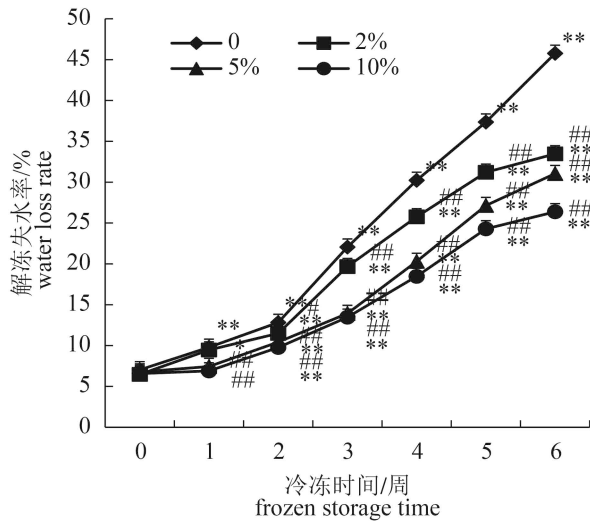


图5 解冻失水率的变化

Fig. 5 The changes of the water loss rate during frozen storage

3 讨论

红藻糖苷在保护细胞失水, 保护蛋白质等大分子变性和抗氧化等方面有其独特而显著的功能, 但是由于制备工艺的限制, 国内外对其应用的研究极少, 因此, 通过优化提取工艺获得大量样品, 将有利于红藻糖苷的后续研究。

研究证实, 引起冷冻鱼糜蛋白变性的根本原因是蛋白质分子中冰晶的形成, 冰晶的析出会破坏结合水和蛋白质的结合状态, 影响维系蛋白质空间结构次级键的分布, 导致某些化学键断裂或形成, 从而破坏肌原纤维蛋白的空间结构, 影响蛋白质的特性。因此蛋白中盐溶性蛋白含量的变化、 Ca^{2+} -ATP酶活性的变化、总巯基含量的变化, 都是反映鱼糜冷冻过程中品质变化的主要参数^[13-16]。本研究中, 冷冻造成了草鱼鱼糜的盐溶蛋白含量、肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATP酶活性等参数的变化。

红藻糖苷是红藻中重要的渗透压调节物质, 它与海藻糖在植物中的作用类似, 因此, 很可能与海藻糖的抗冻机理相似, 能使蛋白处于饱和状态, 同时束缚水分, 从而有效降低蛋白质的变性^[6]。本研究表明, 红藻糖苷能够减缓盐溶蛋白的下降; 减缓冷冻鱼糜巯基含量的下降, 保护了蛋白质的结构, 防止蛋白质的变性, 从而使 Ca^{2+} -ATP酶活的下降减少, 并抑制鱼糜在解冻时保水能力的降低。

4 结论

通过响应面分析法优化了红藻糖苷的醇提工艺: 乙醇72.3%、提取温度60℃、时间4 h、液料比14:1 (mL/g), 在此条件下的提取率为3.48%。同时, 在鱼糜中添加一定量的红藻糖苷, 可以有效抑制冷冻过程中的蛋白质变性, 提高冷冻草鱼鱼糜的品质, 且以10%的红藻糖苷处理效果最好。由于红藻糖苷在红藻中的含量非常丰富, 工艺简单, 因此作为鱼类蛋白的抗冷冻保护剂在食品工业中的应用前景广泛。

参考文献:

- [1] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 197-203.
Ji M H. Seaweed Chemistry of Seaweed[J]. Beijing: Science Press, 2004: 197-203(in Chinese).
- [2] Karsten U, West J A, Zuccarello G C, *et al.* Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35(5): 967-976.
- [3] 张静雅, 陆剑锋, 林琳, 等. 鲢鱼冷冻鱼糜抗冻剂的复配研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(2): 127-132.
Zhang J Y, Lu J F, Lin L, *et al.* Optimization of cryoprotectant formula for silver carp surimi during frozen storage[J]. *Food Science*, 2012, 33(2): 127-132(in Chinese).
- [4] 顾晓慧, 殷邦忠, 王联珠, 等. 我国冷冻鱼糜生产及标准现状分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 303-307.
Gu X H, Yin B Z, Wang L Z, *et al.* Current situation of frozen surimi production and quality standards in China[J]. *Food Science*, 2014, 35(23): 303-307(in Chinese).
- [5] 胡耀辉, 郑微微, 李琢伟, 等. 海藻糖对防止鲤鱼鱼糜蛋白质冷冻变性的研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 126-129.
Hu Y H, Zheng W W, Li Z W, *et al.* Role of Trehalose in preventing the denaturation of proteins in frozen carp surimi[J]. *Food Science*, 2011, 32(9): 126-129(in Chinese).
- [6] 秦小明, 蒙健宗, 宁恩创, 等. 海藻糖在冷冻罗非鱼鱼糜中的抗冻作用研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(7): 79-81.
Qin X M, Meng J Z, Ning E C, *et al.* Investigate the

- effect of trehalose on the freezing preservation of frozen *Java tilapia* surimi[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(7): 79-81(in Chinese).
- [7] 刘欣, 周爱梅, 赵力超, 等. 海藻糖-乳酸钠对冻藏鳙鱼鱼糜蛋白抗冻效果的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 60-64.
Liu X, Zhou A M, Zhao L C, *et al.* Cryoprotective effects of trehalose and sodium lactate on bighead (*Aristichthys nobilis*) surimi during frozen storage[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(8): 60-64(in Chinese).
- [8] Li Y X, Li Y, Lee S H, *et al.* Inhibitors of oxidation and matrix metalloproteinases, floridoside, and D-isofloridoside from marine red alga *Laurencia undulata*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(1): 578-586.
- [9] Courtois A, Simon-Colin C, Boisset C, *et al.* Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway[J]. *Marine Drugs*, 2008, 6(3): 407-417.
- [10] Chen J J, Song D D, Luo Q J, *et al.* Determination of floridoside and isofloridoside in red algae by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Letters*, 2014, 47(14): 2307-2316.
- [11] Yongsawatdigul J, Park J W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin[J]. *Food Chemistry*, 2003, 83(3): 409-416.
- [12] 林建原, 季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(2): 83-90.
Lin J Y, Ji L H. Optimization of flavonoids from ginkgo biloba using response surface analysis[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(2): 83-90(in Chinese).
- [13] 唐小艳, 郑惠娜, 章超桦, 等. 文蛤蛋白质组成分析及其分子量分布研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(22): 362-366.
Tang X Y, Zheng H N, Zhang C H, *et al.* Protein composition analysis and molecular weight distribution of *Meretrix lusoria*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(22): 362-366(in Chinese).
- [14] 丁晨. 海藻胶低聚糖的制备工艺及其应用效果研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2015.
Ding C. Seaweed gel preparation technology and application of oligosaccharide effect research[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2015(in Chinese).
- [15] Seki N, Ikeda M, Narita N. Changes in ATPase activities of carp myofibril during ice-storage[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1979, 45(6): 791-799.
- [16] Lian P Z, Lee C M, Hufnagel L. Physicochemical properties of frozen red hake (*Urophycis chuss*) mince as affected by cryoprotective ingredients[J]. *Journal of Food Science*, 2000, 65(7): 1117-1123.

Extraction of floridoside and the effect of floridoside on *Ctenopharyngodon idella* surimi during frozen storage

GAO Yuli, LI Jiuling, YAN Xiaojun, YANG Rui, ZHANG Chundan, CHEN Haimin*

(Marine Biotechnology Laboratory of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To optimize the ethanol extraction conditions of floridoside and to investigate the effect of floridoside on the myofibrillar protein freezing denaturation of grass carp surimi during frozen storage. Ethanol concentration, extraction temperature, extraction duration and liquor to material ratio were optimized by response surface methods. The salt-solubility of myofibrillar protein, sulfhydryl content, and Ca^{2+} -ATPase activity, etc in surimi after being frozen for 6 weeks were detected. Results showed that the optimal extracting condition for floridoside was 72.3% ethanol with liquor to material ratio of 14:1 (mL/g), the extracting temperature was 60 °C, and the extracting time should be 4 h. Under these optimal conditions, the highest extraction ratio was 3.48%. Salt-soluble protein, sulfhydryl group contents, Ca^{2+} -ATPase activity were effectively enhanced, and the water loss was decreased by addition of floridoside in surimi. After 4 weeks frozen, salt-soluble protein and sulfhydryl group contents were enhanced by 30.62% and 32.80%; Ca^{2+} -ATPase activity in myofibrillar proteins was reduced by 37.51% in 10% floridoside treated group, while the water loss ratio was 133.07% lower than that of the control group. This study indicates that floridoside can effectively prevent myofibrillar protein denaturation during frozen storage.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; surimi; floridoside; response surface method; protein freezing denaturation

Corresponding author: CHEN Haimin. E-mail: chenhaimin@nbu.edu.cn

Funding projects: National Public Welfare Industry Project Special Marine Scientific Research Funds (201505033); Ningbo Science and Technology Research Projects (2014C10044)